

Doktori értekezés tézisei

**Autoantitest profil és B sejt epitópok
vizsgálata citrullinált peptidek segítségével
rheumatoid arthritisben és a
patomechanizmus vizsgálata a betegség
egér modelljében**

Szarka Eszter

Témavezető: Prof. Sármai Gabriella, egyetemi tanár



ELTE TTK Biológia Doktori Iskola

Immunológia Program

Programvezető: Prof. Erdei Anna, egyetemi tanár

ELTE TTK, Immunológiai Tanszék

2014

Bevezetés

A rheumatoid arthritis (RA) krónikus, autoimmun betegség, melynek fő jellemzője elsősorban a kéz és láb kisízületeiben szimmetrikusan jelentkező ízületi gyulladás. Az autoimmun folyamat lényege, hogy bizonyos saját ízületi fehérjék ellen immunválasz alakul ki, ennek következménye az ízületi csont és porc degradációja. Az RA kialakulásában genetikai tényezőknek, környezeti hatásoknak, fertőzéseknek egyaránt szerepük van. A rheumatoid arthritis jelenleg nem gyógyítható véglegesen, de hatékony kezelésére van lehetőség. A kezelés hatékonyságának növelésében, a szövetkárosodás elkerülése érdekében fontos a betegség mielőbbi diagnosztizálása. Az anti-citrullinált protein autoantitestek (ACPA) egyes citrullinált fehérjéket felismerő ellenanyagok. A jelenleg kereskedelembe kapható, ACPA kimutatására alkalmas kit-ek valószínűleg nem fedik le a teljes ACPA repertoárt. A betegség kialakulása előtt akár 5 - 10 évvel kimutatható ACPA a szérumból, ezért a betegség előrejelzésére már tünetmentes állapotban is alkalmazható.

A rheumatoid arthritis kísérletes állatmodelljei rendkívül fontos szerepet játszanak a betegség patomechanizmusának

jobb megértésében, valamint a hatékony és biztonságos terápia fejlesztésében. A kollagén indukált arthritis (CIA) a humán rheumatoid arthritis széles körűen alkalmazott állatmodellje, annak rendkívül hasonló immunológiai háttere miatt. A betegség DBA/1 egértörzsben váltható ki II típusú szarvasmarha kollagén oltásával. Az kollagén-anti-kollagén IgG tartalmú immunkomplexek fontos tényezők az arthritis patogenezisében: szabályozó szerepük van mind a CIA centrális, mind pedig az effektor fázisában.

Célkitűzések

Munkánk során egyrészt az RA diagnosztizálásra alkalmazható citrullin ill. arginin tartalmú peptideket vizsgáltunk (A), másrészt a betegség egér modelljében vizsgáltuk az immunkomplexek szerepét a betegség patomechanizmusában (B).

A, A rheumatoid arthritis diagnosztizálása és prognosztizálása során alkalmazható, új citrullin tartalmú peptidek azonosítása, amelyek egyben alkalmasak egy jövőbeni terápia fejlesztésére.

Kérdések:

- A filaggrin, vimentin, kollagén citrullinált peptid-panel alkalmas-e az autoantitest profil meghatározására, és ad-e többletinformációt a jelenleg elérhető kitekkel (anti-CCP2) összehasonlítva?
- Felismerik-e az RA betegek B sejtjeinek receptorai (BCR) az előző vizsgálatok során azonosított citrullin tartalmú peptideket?
- Alkalmasak-e a citrullin tartalmú peptidek a B sejtek autoantitest termelésének vizsgálatára?

B, További célunk a betegség patomechanizmusának vizsgálata, különös tekintettel az immunkomplex-mediált folyamatokra CIA modellben. A kezelés során négy csoportot vizsgáltunk: a kontroll CIA állatokat, a kollagén peptid-extravidin tetramerrel oltott állatokat, a 2.4G2 egyláncú (FcγRII/III specifikus) ellenanyag – extravidin tetramerrel oltott állatokat, ill. a mesterséges 'immunkomplexszel' (kollagén peptid – extravidin- 2.4G2) kezelt állatokat.

Kérdések:

- Eltér-e a CIA-ban a betegség kialakulása és lefolyása a fenti állatsoportokban a különböző komplexekkel való kezelés hatására?
- Milyen sejtekhez kötődnek a komplexek in vitro és in vivo?
- Befolyásolják-e a komplexek a kollagén fehérje elleni és a kollagén peptid elleni ellenanyagtermelést?
- Változik-e a citokin- és kemokintermelés a különböző komplexek hatására a CIA egerekben?

Módszerek

- Multipin ELISA, indirekt ELISA, kompetitív ELISA
- ELISpot
- humán B-sejt izolálás
- áramlási citofluorimetria (FACS)
- kollagén indukált arthritis indukció
- rekombináns fehérje tisztítás
- konfokális mikroszkópia
- citokin array

Eredmények

- Az általunk beállított citrullin-peptid-panel segítségével lehetővé válik a CCP negatívként diagnosztizált rheumatoid arthritises betegek detektálása.
- Kimutattuk, hogy bár a citrullinált vimentin fehérjét felismerő autoantitestek keresztreagálnak a filaggrin peptiddel, a filaggrin peptidet felismerő ellenanyagok nem keresztreagálnak a vimentin immunodomináns epitópjával.
- A citrullin tartalmú filaggrin és vimentin peptidek segítségével lehetővé vált az autoreaktív RA B sejtek áramlási citometriás detektálása, valamint az *in vitro* autoantitest termelés mérése RA-ban.
- A citrullin peptid stimulációra adott citokinválasz vizsgálata hasznos információval szolgálhat az RA betegek kezelésének megválasztásában.
- A betegség patomechanizmusát vizsgálva CIA modellben megállapítottuk, hogy a CII peptidet tartalmazó immunkomplexek hatására fokozódik a kollagén peptid specifikus IgG2a ellenanyag valamint

számos pro-inflammatorikus citokin és kemokin termelése.

- Kimutattuk, hogy az IgG2a tartalmú immunkomplexek felelősek a gyulladásos környezet fenntartásáért, és az autoreaktivitás pozitív visszacsatolásáért.

Diszkusszió

Az általunk beállított és jellemzett, citrullin-peptid-panel specificitása és szenzitivitása összevethető a kereskedelmi forgalomban lévő diagnosztikai kitekével, ezen felül a panel jelentős mértékben képes olyan betegek detektálására is, akik a korábbi tesztekben CCP negatívnak bizonyultak. Felvázoltunk egy, az epitóp spreading során bekövetkező lehetséges változást a peptidek felismerésében. A peptid-panel alkalmasnak bizonyult az autoreaktív B-sejtek detektálására is. *In vitro* RA PBMC kultúrában, a peptid stimuláció hatására a betegek többségében IFN γ és IL-17 gyulladásos citokinek termelődését figyeltük meg, míg több beteg anti-inflammatorikus IL-10 termeléssel reagált. Mindezek alapján, a peptid-panel alkalmas, diagnosztikai

célú kutatásokra, továbbfejlesztve segítség lehet a személyre szabott terápia fejlesztésében.

A kollagén indukált arthritises egerekben a betegség súlyosbodását tapasztaltuk Fc γ RII/III-hoz irányító 2.4G2-CII peptid komplex, kisebb mértékben a 2.4G2 tetramer és a CII peptid tetramer hatására. Jelentősen fokozódott a CII peptid specifikus IgG2a izotípusú inflammatórikus ellenanyag termelődése a 2.4G2-CII peptid komplexszel oltott állatokban. Megfigyeléseink szerint a 2.4G2-CII komplexek, illetve az in vivo kialakult IgG2a-CII peptid immunkomplexek az aktiváló Fc γ RIII-hoz, és/vagy az Fc γ RIV-hez kötődnek, indukálják a makrofágok és dendritikus sejtek IL-23 szekrécióját. A termelődött gyulladásos citokinek közül több is kulcsfontosságú az autoreaktív arthritis kialakulásában. Összefoglalva, a mesterséges immunkomplexek fokozzák a gyulladásos Th1 mediált, autoreaktív IgG2a választ.

Közlemények az értekezés témájában

E. Szarka, F. Babos, A. Magyar, K. Huber, Z. Szittner, K. Papp, J. Prechl, J. Pozsgay, G.Nagy, B. Rojkovich, T. Gáti, J Kelemen, Z. Baka, M. Brózik, B. Pazár, G. Poór, F. Hudecz and G. Sármay

Recognition of new citrulline containing peptide epitopes by autoantibodies produced *in vivo* and *in vitro* by B cells of Rheumatoid arthritis patients **IMMUNOLOGY** (2013) 141(2):181-91. IF: 3.705

F. Babos, E. Szarka, G. Nagy, Z. Majer, G. Sármay, A. Magyar, F. Hudecz

The role of *N*- or *C*-terminal biotinylation in antibody recognition of citrullin containing filaggrin epitope peptides in Rheumatoid arthritis **BIOCONJUGATE CHEMISTRY 24:** (5), *pp* 817–827 (2013) IF: 4.58

Szarka E*, Neer Z*, Balogh P, Adori M, Angyal A, Prechl J, Kiss E, Kovesdi D, Sarmay G

Exacerbation of collagen induced arthritis by Fcγ receptor targeted collagen peptide due to enhanced inflammatory chemokine and cytokine production.

BIOLOGICS: TARGETS & THERAPY 6: pp. 101-115. (2012) (*: megosztott első szerzők)

Baka Z, Barta P, Losonczy G, Krenacs T, Papay J, Szarka E, Sarmay G, Babos F, Magyar A, Geher P, Buzas EI, Nagy G
Specific expression of PAD4 and citrullinated proteins in lung cancer is not associated with anti-CCP antibody production **INTERNATIONAL IMMUNOLOGY 23:**(6) pp. 405-414. (2011) IF: 3.301

Harre U, Georgess D, Bang H, Bozec A, Axmann R, Ossipova E, Jakobsson PJ, Baum W, Nimmerjahn F, Szarka E, Sarmay G, Krumbholz G, Neumann E, Toes R, Scherer HU, Catrina AI, Klareskog L, Jurdic P, Schett G
Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. **JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION 122:**(5) pp. 1791-1802. (2012) IF: 14.152